An das Deutsche Petentemi TSCHES PATENTAMT 80297 MDnchon Bendungen des Deutschen Patentemie eind zu richten en: 0 Antrag In de Herrn Patentanwalt Anachrill auf Erteilung eines Patents Dr. Hans D. Boeters Straße, HAS-Nr. Bereiteranger 15 und egi. Postiech 3700pa 81541 München 196 39 456.2 Kalchandes Associations Ventreiers (max. 20 Stellen) 20 Sept. 1996 TUB9765 UOV 86 ggi, Nr. der Allgemeinen Veltriecht Der Empflager in Feld (1) bil der 3 X Vertreter Arenelder Zustellungsbevollmächligte Vertreter Anmelder 4 Dr. Hans D. Boeters Qesellschaft für Biotech-Dipl.-Ing. Robert Bauer nologische Forschung mbH (GBF) Dr. Enno Meyer von Fall (1) Mascheroder Weg 1 Bereiteranger 16 38124 Braunschweig 81541 München Zustwitedre Bcode-Nr. Vertretercode-Nr. Anmaldercode-Nt. powell (5) bekanni Bezeichnung der Erfindung (bei überänge auf gesondertem Sisti - 2fach) (3) Epothilon-Derivate, Herstellung und Mittel 0 Sonstige Antrage Die Anmeldung ist Zusatz zur Palentanmeldung (zum Patent) --> s. Edado-Pr0fungsantrag - Pr0lung der Anmeldung (§ 44 Palentgesetz) Recherchenantrag - Ermittung der öffentlichen Druckschritten ohne Prütung (§ 43 Pateragesetz) Kaster House Profungsveriahren Recherchenverfahren Lieferung von Ablichtungen der ermittellen Druckschriften im aut der Aussetzung des Enetungsbeschlusses auf Monate (§ 49 Abs. 2 Palentgesetz) (Max. 15 Mon. ab Anmelde oder Prioritissag) Rückseto Aldenzeichen der Stammarmeleung ➂ Tellung/Ausscheidung aus der Petentanmeldung --an Lizenzvergabe interessiert (unverbindlich) thit verzeitiger Offenlegung und damit treier Akterialnsicht einverstanden (5 31 Abs. 2 Nr., 1 Palentgesetz) Inländische Priorität (Dalum, Aklenzeichen der Voranmeidung) bel Oberlánge auf gewondertem Blatt - Żiech) -Auslandische Priorität (Dalum Land, Aktonz, der Voranmeldu Lat better places Abbuchung von mei Gebührenzehlung in Höhe von 100,00 0 Monchen Observeloung (nach Ernak (bige night auf & Flocksale bigber, ggt, auf gesond, (bed) (I) Anlagen 25.09.96 X Telefax vorab am Vertre tervolmachit Erladerbenennung \_ Zvakmmenlasaung (ggl. mil Zelchnung) ZO Selle(n) Beachreibung ggi. Bezugezeichentlete Selle(n) Palentanaprûche Anzahi Patentanapriliche

Unterschillt(en)

PAK 02 Carl Hoymanns Verlag KU, Usambulger Susda 449, 50939 KUL.

02191 96, d39 52

30CCCQ ED ED+ 39 5371 708

Blas Zeichnungen

P 2007

Abectyth(en) d. Voranmeid.

Bestell-Nr. 02410 Nechdruck verbaten

2EP. 25. 36 16:2/ 49 89 653962

#### **BOETERS & BAUER**

PATENTANWÄLTE EUROPEAN PATENT ATTORNEYS

BEREITERANGER 15 D-81541 MÜNCHEN

PAS BOETERS & BAUER BEREITERANGER 15, D-81641 MÜNCHEN

DIPL.-CHEIN. OR. MANS D. BOETERS DIPL.-ING. ROBERT BAUER PHYS. DR. ENNO MEYER

TBLEFON: (089) 65 00 86 TBLEFAX: (089) 65 39 62

TELEGRAMME PROVENTION, MUNCHEN

25. September 1996/he

Unser Zeichen: 8299-GBF

#### Epothilonderivate, Herstellung und Mittel

Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Epothilonderivate und deren Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Herstellung der Epothilonderivate der nachfolgend dargestellten allgemeinen Formeln 1 bis 7 sowie deren Verwendung zur Herstellung von therapeutischen Mitteln und Mitteln für den Pflanzenschutz.

$$\begin{array}{c} & & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & \\ & & & \\ & &$$

$$R^{1}O$$
 $R^{2}O$ 
 $OR^{4}$ 
 $OR^{4}$ 
 $OR^{4}$ 
 $OR^{5}$ 
 $OR^{5}$ 

In den vorstehenden Formeln 1 bis Formel 7 bedeuten:

R = H, C<sub>1-4</sub>-Alkyl;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> = H, C<sub>1-6</sub>-Alkyl,

C<sub>1-6</sub>-Acyl-Benzoyl,

C<sub>1-4</sub>-Trialkylsilyl,

Benzyl,

Phenyl,

C<sub>1-6</sub>-Alkoxy-,

C<sub>6</sub>-Alkyl-, Hydroxy- und Halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl;

wobei auch zwei der Reste  $R^1$  bis  $R^5$  zu der Gruppierung  $-(CH_2)_n$ -mit n=1 bis 6 zusammentreten können und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl-bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt.

In der Formel 1 sind X und Y entweder gleich oder verschieden und stehen jeweils für Halogen, OH, O- $(C_{1-6})$ -Acyl, O- $(C_{1-6})$ -Alkyl, O-Benzoyl.

In der Formel 3 steht X allgemein für -C(0)-, -C(S)-, -S(0)-,  $-C(R^1R^2$ -, wobei  $R^1$  und  $R^2$  die Bedeutung haben wie oben angegeben, und  $-SiR_2$ -, wobei R die Bedeutung hat wie oben angegeben.

In der Formel 4 bedeutet X Sauerstoff,  $NOR^3$ ,  $N-NR^4R^5$ , und  $N-NHCONR^4R^5$ , wobei die Reste  $R^3$  bis  $R^5$  die oben angegebene Bedeutung haben.

In der Formel 5 bedeutet X Wasserstoff,  $C_{1-18}$ -Alkyl,  $C_{1-18}$ -Acyl, Benzyl, Benzyl und Cinnamoyl.

Für Epothilon A und B sei verwiesen auf DE-A-41 38 042.

Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 1 sind ausgehend von Epothilon A und B sowie von deren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Öffnung des 12,13-Epoxids zugänglich. Werden dazu

Hydrogenwasserstoffsäuren in einem bevorzugt nicht wässrigen Lösungsmittel eingesetzt, wobei man die Halogenhydrine X = Hal, Y = OH und Y = OH, Y = Hal erhält. Protonensäuren wie z.B. Toluolsulfonsäure und Trifluoressigsäure führen in Gegenwart von Wasser zu 12,13-Diolen, die anschließend nach Standardverfahren acyliert (z.B. mit Carbonsäureanhydriden und Pyridin oder Triethylamin/DMAP) oder alkyliert (Alkylhalogenide und Silberoxid) werden. Die 3- und 7-Hydroxygruppen können dazu vorübergehend als Formiat (Abspaltung mit NH3/MeOH) oder p-Methoxybenzylether (Abspaltung mit DDQ) geschützt werden.

Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 2 sind aus Epothilon A und B sowie deren 3-0- und/oder 7-0-geschützten Derivaten durch Reduktion, z.B. mit NaBH4 in Methanol erhältlich. Sind dabei 3-OH und/oder 7-OH reversibel geschützt, so können nach Acylierung oder Alkylierung und Entfernen der Schutzgruppen 5-0-monosubstituierte, 3,5- oder 5,7-0-disubstituierte Derivate der allgemeinen Formel 2 erhalten werden.

Umsetzungen von Epothilon A und B mit bifunktionellen elektrophilen Reagenzien, wie (Thio)Phosgen, (Thio)Carbonyldimidazol, Thionylchlorid oder Dialkylsilyldichloriden bzw. -bistriflaten ergeben Verbindungen der allgemeinen Formel 3. Als Hilfsbasen dienen dabei Pyridin, Trialkylamine, ggf. zusammen mit DMAP bzw. 2,6-Lutidin in einem nichtprotischen Lösungsmittel. Die 3,7-Acetale der allgemeinen Formel 3 entstehen durch Umacetalisierung z.B. von Dimethylacetalen in Gegenwart eines sauren Katalysators.

Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 4 werden aus Epothilon A und B oder ihren 3-0- und/oder 7-0-geschützten Derivaten durch Ozonolyse und reduktive Aufarbeitung, z.B. mit Dimethylsulfid, erhalten. Die C-16-Ketone können anschließend nach dem Fachmann geläufigen Standardverfahren in Oxime, Hydrazone oder Semicarbazone umgewandelt werden. Sie werden weiterhin durch Wittig-, Wittig-Horner-, Julia- oder Petersen-Olefinierung in C-16/C-17-Olefine überführt.

Durch Reduktion der C-16-Ketogruppe, z.B. mit einem Aluminiumoder Borhydrid, sind die 16-Hydroxyderivate gemäß der allgemeinen
Formel 5 erhältlich. Diese können, wenn 3-OH und 7-OH mit
entsprechenden Schutzgruppen versehen sind, selektiv acyliert
oder alkyliert werden. Die Freisetzung der 3-OH- und 7-OH-Gruppen
erfolgt z.B. bei O-Formyl durch NH<sub>3</sub>/MeOH, bei O-p-Methoxybenzyl
durch DDQ.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel 6 werden aus Derivaten von Epothilon A und B erhalten, bei denen die 7-OH-Gruppe durch Acyl- oder Ethergruppen geschützt ist, in dem die 3-OH-Gruppe z.B. formyliert, mesyliert oder tosyliert und anschließend durch Behandlung mit einer Base z.B. DBU eliminiert wird. Die 7-OH-Gruppe kann wie oben beschrieben freigesetzt werden.

Verbindungen der allgemeinen Formel 7 werden aus Epothilon A und B oder deren 3-OH- und 7-OH-geschützten Derivaten durch basische Hydrolyse erhalten, z.B. mit NaOH in MeOH oder MeOH/Wasser. Vorzugsweise werden Verbindungen der allgemeinen Formel 7 aus Epothilon A oder B oder deren 3-OH- oder 7-OH-geschützten Derivaten durch enzymatische Hydrolyse erhalten, insbesondere mit Esterasen oder Lipasen. Die Carboxylgruppe kann mit Diazoalkanen nach Schutz der 19-OH-Gruppe durch Alkylierung in Ester umgewandelt werden.

Ferner können Verbindungen der Formel 7 durch Lactonisierung nach den Methoden von Yamaguchi (Trichlorbenzoylchlorid/DMAP), Corey (Aldrithiol/Triphenylphosphin) oder Kellogg (omega-Bromsäure/Caesiumcarbonat) in Verbindung der Formel 2 umgewandelt werden. Einschlägige Arbeitsmethoden finden sich bei

Inanaga et al. in Bull. Chem. Soc. Japan, 52 (1979) 1989; Corey & Nicolaou in J. Am. Chem. Soc., 96 (1974) 5614; und Kruizinga & Kellogg in J. Am. Chem. Soc., 103 (1981) 5183. Die Erfindung betrifft ferner Mittel für den Pflanzenschutz in Landwirtschaft, Forstwirtschaft und/oder Gartenbau, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilonderivate bzw. bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilonderivate neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Schließlich betrifft die Erfindung therapeutische Mittel, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen oder einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n). Diese Mittel können insbesondere cytotoxische Aktivitäten entwickeln und/oder Immunsuppression bewirken, so daß sie besonders bevorzugt als Cytostatika verwendbar sind.

Die Erfindung wird im folgenden durch die Beschreibung von einigen ausgewählten Ausführungsbeispielen näher erläutert und beschrieben.

#### Beispiele

# Beispiel 1: Verbindung la

1--

20 mg (0.041 mmol) Epothilon A werden in 1 ml Aceton gelöst, mit 50  $\mu$ l (0.649 mmol) Trifluoressigsäure versetzt und über Nacht bei 50 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 85:15).

Ausbeute: 4 mg (19 %) Isomer I
4 mg (19 %) Isomer II

#### Isomer I

R<sub>f</sub> (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.46

IR (Film): ny = 3440 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1734 (vs), 1686 (m), 1456 (m), 1375 (w), 1256 (s, Sch), 1190 (w, b, Sch), 1071 (m, Sch), 884 (w), 735 (w) cm<sup>-1</sup>.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (43 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), 394 (47), 306 (32), 206 (30), 181 (40), 166 (72), 139 (100), 113 (19), 71 (19), 57 (24), 43 (24).

Hochauflösung: C26H39O6NS ber.: 493.2498 für [M-H2O] \* gef.: 493.2478

#### Isomer II

# R<sub>f</sub> (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.22

IR (Film): ny = 3484 (s, b, Sch), 2942 (vs, Sch), 1727 (vs), 1570 (w), 1456 (m), 1380 (m), 1265 (s), 1190 (w), 1069 (m), 975 (w), cm<sup>-1</sup>.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (21 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), 394 (12), 306 (46), 206 (37), 181 (63), 166 (99), 139 (100), 113 (21), 71 (23), 57 (33), 43 (28).

Hochauflösung: C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>O<sub>6</sub>NS ber.: 493.2498 für [M-H<sub>2</sub>O] + gef.: 493.2475

## Beispiel 2: Verbindung 1b

55 mg (0.111 mmol) Epothilon A werden in 0.5 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 0.5 ml 1 N Salzsäure versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 N Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtenromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol, 90 : 10). Ausbeute: 19 mg (32 %)

R<sub>f</sub> (Dichlormethan/Methanol, 90 : 10): 0.46

IR (Film): ny = 3441 (s. br., Sch), 2948 (s. Sch), 1725 (vs. Sch), 1462 (m), 1381 (w), 1265 (m), 1154 (w), 972 (m, br., Sch) cm<sup>-1</sup>.

 $\underline{UV}$  (Methanol): lambda<sub>max</sub> (lg epsilon) = 210 (4.29), 248 (4.11) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 529 (13 [M<sup>+</sup>]), 494 (10), 342 (38), 306 (23), 194 (32), 164 (100), 140 (31), 113 (15), 57 (16).

Hochauflösung: C26H40O6ClNS ber.: 529.2265 für [M+], gef.: 529.2280

# Beispiel 3: Verbindung 1c

25 mg (0.047 mmol) 12-Chlor-13-hydroxy-epothilon A (1b) werden in 1 ml Dichlormethan gelöst, mit 29 mg (0.235 mmol) Dimethylaminopyridin, 151  $\mu$ l (1.081 mmol) Triethylamin und 20  $\mu$ l (0.517

mmol) 98 %-iger Ameisensäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wird mit Eis/Natriumchlorid abgekühlt. Nach Erreichen von -15 °C werden dem Reaktionsgemisch 40  $\mu$ l (0.423 mmol) Essigsäureanhydrid zugegeben und 70 Minuten bei -15 °C gerührt. Nachdem ein Dünnschichtchromatogramm keinen vollständigen Umsatz anzeigt, werden dem Reaktionsgemisch weitere 6 mg (0.047 mmol) Dimethylaminopyridin, 7  $\mu$ l (0.047 mmol) Triethylamin, 2  $\mu$ l 98 %-ige Ameisensäure (0.047 mmol) und 4  $\mu l$  (0.047 mmol) Essigsäureanhydrid zugesetzt und 60 Minuten gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt, mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der praparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 90: 10). Ausbeute: 5 mg (18 %)

Rf (Dichlormethan/Aceton. 90 : 10):

65

E.

0.67

IR (Film): 3497 (w, b, Sch), 2940 (s, b, Sch), 1725 ny = (vs), 1468 (m, b, Sch), 1379 (m), 1265 (s), 1253 (s), 1175 (vs), 972 (m, b, Sch),  $737 (s) cm^{-1}$ 

MS (20/70 eV): m/e (%) = 613 (9 [M<sup>+</sup>]), 567 (43), 472 (63), 382 (23), 352 (21), 164 (100), 151 (33), 96 (31), 69 (17), 44 (26).

Hochauflösung: C29H40O9NSC1 ber.: 613.2112 für [M+]

gef .:

613.2131

# Beispiel 4: Verbindung 1d

10 mg (0.020 mmol) Epothilon B werden in 0.5 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 0.5 ml 1 N Salzsäure versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

Ausbeute: 1 mg (9 %)

R<sub>f</sub> (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 543 (3 [M<sup>+</sup>]), 507 (14), 320 (19), 234 (9), 194 (17), 182 (23), 164 (100), 140 (22), 113 (14), 71 (13).

Hochauflösung: C27H42O6NSCl ber.: 543.2421 für [M+]
gef.: 543.2405

# Beispiel 5: Verbindung 2a

100 mg (0.203 mmol) Epothilon A werden in 4 ml Tetrahydrofuran/1 M Phosphatpuffer pH 7 (1:1) gelöst und solange mit Natriumborhydrid (150 mg = 3.965 mmol) versetzt bis das Edukt laut Dünnschichtchromatogramm vollständig abreagiert ist. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 verdünnt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Kieselchromatographie

(Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 95 : 5 - grad - nach Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

Ausbeute: (20 %)

R<sub>f</sub> (Dichlormethan/Aceton, 75 : 25): 0.27

IR (Film): ny = 3413 (s, b, Sch), 2965 (vs, Sch), 1734 (vs), 1458 (m, b, Sch), 1383 (m, Sch), 1264 (s, b, Sch), 1184 (m, b, Sch), 1059 (s, Sch), 966 (s), 885 (w), 737 (m) cm<sup>-1</sup>

MS (20/70 eV); m/e (%) = 495 (6 [M+]), 477 (8), 452 (12), 394 (9), 364 (16), 306 (49), 194 (19), 178 (35), 164 (100), 140 (40), 83 (21), 55 (27).

Hochauflösung: C<sub>26</sub>H<sub>41</sub>O<sub>6</sub>NS ber.: 495.2655 für (M<sup>+</sup>) gef.: 495.2623

# Beispiel 6:

Verbindung 3a-d (a-d sind Stereoisomere)

100 mg (0.203 mmol) Epothilon werden in 3 ml Pyridin gelöst, mit 50  $\mu$ l (0.686 mmol) Thionylchlorid versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes und Trennung der vier Stereoisomeren 3a-d erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

Verbindung 3a

Ausbeute: 4 mg (12 %)

R<sub>f</sub> (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.50

IR (Film): ny = 2961 (m, b, Sch), 1742 (vs), 1701 (vs),
1465 (m, Sch), 1389 (m, Sch), 1238 (s,
Sch), 1210 (vs, Sch), 1011 (s, Sch), 957
(s, b, Sch), 808 (m, Sch), 768 (s, Sch)
cm<sup>-1</sup>

UV (Methanol): lambda<sub>max</sub> (lg epsilon) = 210 (4.50), 248 (4.35) nm.

 $\frac{MS (20/70 \text{ eV});}{(27), 222 (30), 178 (30), 164 (100), 151}$  (43), 96 (38), 69 (29), 55 (28), 43 (20).

Hochauflösung: C26H37O7NS2 ber.: 539.2011 für [M+]

Verbindung 3b

Ausbeute: 14 mg (13 %)

R<sub>f</sub> (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.44

IR (Film): ny = 2963 (s, br, Sch), 1740 (vs), 1703 (s),
1510 (w), 1464 (m, br, Sch), 1389 (m,
Sch), 1240 (s, br, Sch), 1142 (m), 1076
(w), 1037 (w), 1003 (m), 945 (s, br, Sch),
806 (m, Sch), 775 (s), 737 (m) cm<sup>-1</sup>.

UV (Methanol): lambda<sub>max</sub> (lg epsilon) = 211 (4.16), 250 (4.08) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (27 [M<sup>+</sup>]), 475 (17), 322 (41), 306 (67), 222 (16), 206 (17), 194 (19), 178 (32), 164 (100), 151 (33), 125 (18), 113 (15), 96 (39), 81 (23), 64 (58), 57 (42), 41 (19).

Hochauflösung: C26H37O7NS2 ber.: 539.2011 für [M+] gef.: 539.1998

Verbindung 3c

Ausbeute: 4 mg (4 %)
Rf (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (51 [M<sup>+</sup>]), 322 (22), 306 (53), 222 (36), 178 (31), 164 (100), 151 (41), 96 (25), 81 (20), 69 (26), 55 (25), 41 (25).

Hochauflösung: C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>O<sub>7</sub>NS<sub>2</sub> ber.: 539.2011 für [M<sup>+</sup>] gef.: 539.2001

Verbindung 3d

Ausbeute: 1 mg (1 %)

R<sub>f</sub> (Tolucl/Methanol, 90 : 10): 0.33

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (69 [M<sup>+</sup>]), 322 (35), 306 (51), 222 (41), 178 (31), 164 (100), 151 (46), 96 (31), 81 (26), 69 (34), 55 (33), 41 (35)

Hochauflösung: C26H37O7NS2 ber.: 539.2011 für [M+]

gef.: 539.1997

# Beispiel 7: Verbindung 4a

10 mg (0.020 mmol) Epothilon A werden in 2 ml Dichlormethan gelöst, auf -70 °C abgekühlt und anschließend 5 Minuten mit Ozon bis zur schwachen Blaufärbung behandelt. Das resultierende Reaktionsgemisch wird anschließend mit 0.5 ml Dimethylsulfid versetzt und auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch vom Lösungsmittel befreit und schließlich durch präparative Schichtchromatographie (Laufmittel Dichlormethan/Aceton/Methanol, 85 : 10 : 5) gereinigt.

Ausbeute: 5 mg (64 %)

R<sub>f</sub> (Dichlormethan/Aceton/Methanol, 85 : 10 : 5):

0.61

IR (Film): ny = 3468 (s, br, Sch), 2947 (s, br, Sch), 1734 (vs, Sch), 1458 (w), 1380 (w), 1267 (w), 1157 (w), 1080 (w), 982 (w) cm<sup>-1</sup>.

UV (Methanol): lambda<sub>max</sub> (lg epsilon) = 202 (3.53) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 398 (2 [M<sup>+</sup>]), 380 (4), 267 (14), 249 (17), 211 (20), 193 (26), 171 (34), 139 (34), 111 (40), 96 (100), 71 (48), 43 (50).

Hochauflösung: C21H34O7 ber.:

398.2305 für [M<sup>+</sup>]

gef.:

398.2295

## Beispiel 8: Verbindung 6a

(:

10 mg (0.018 mmol) 3,7-Di-O-formyl-epothilon A werden in 1 ml Dichlormethan gelost, mit 27  $\mu$ l (0.180 mmol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt und 60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer pH 4.5 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Nach Beseitigung des Lösungsmittel wird das resultierende Rohprodukt in 1 ml Methanol gelöst, mit 200  $\mu$ l einer ammoniakalischen Methanollösung (2 mmol NH3/ml Methanol) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

# Ausbeute: 4 mg (22 %)

R<sub>f</sub> (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.46

IR (Film): ny = 3445 (w, br, Sch), 2950 (vs, br, Sch),
1717 (vs, Sch), 1644 (w), 1466 (m, Sch),
1370 (m, SCh), 1267 (s, br, Sch), 1179 (s,
Sch), 984 (s, Sch), 860 (w), 733 (m) cm<sup>-1</sup>

<u>UV (Methanol)</u>: lambda<sub>max</sub> (lg epsilon) = 210 (4.16) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 475 (28 [M<sup>+</sup>]), 380 (21), 322 (37), 318 (40), 304 (66), 178 (31), 166 (100), 151 (29), 140 (19), 96 (38), 81 (20), 57 (26).

Hochauflösung: C26H37O5NS ber.: 475.2392 für [M+] gef. 475.2384

# Beispiel 9: Verbindung 6b

50 mg (0.091 mmol) 3,7-Di-O-formyl-epothilon A (werden in 1 ml Dichlorethan gelöst, mit 2 ml (0.013 mol)

1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt und 12 stunden bei 90 °C gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer pH 4.5 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des aus zwei Verbindungen bestehenden Rohproduktes erfolgt mittels präparativer Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 90 : 10).

Ausbeute: 7 mg (15 %)

Substanzcode

Rf (Dichlormethan/Aceton, 90 : 10):

0.62

IR (Film): ny = 2951 (m, br, Sch), 1723 (vs), 1644 (w, br, Sch), 1468 (w), 1377 (w), 1271 (m, br, Sch), 1179 (s), 987 (m, br, Sch), 735 (w, br, Sch) cm<sup>-1</sup>.

UV (Methanol): lambda<sub>max</sub> (lg epsilon) = 210 (4.44) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 503 (68 [M<sup>+</sup>]), 408 (58), 390 (32), 334 (25), 316 (34), 220 (21), 206 (27), 194 (20), 181 (33), 164 (100), 151 (34), 139 (28), 113 (20), 96 (82), 81 (33), 67 (24), 55 (26), 43 (22).

Hochauflösung: C27H37O6NS ber.: 503.2342 für [M+] gef.: 503.2303

# Beispiel 10: Verbindung 6c

5 mg (0.009 mmol) 3,7-Di-O-acetyl-epothilon werden in 1 ml Methanol gelöst, mit 150  $\mu$ l einer ammoniakalischen Methanollösung (2 mmol NH3/ml Methanol) versetzt und über Nacht bei 50 °C gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der praparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

## Ausbeute: 3 mg (67 %)

R<sub>f</sub> (Dichlormethan/Aceton, 90 : 10): 0.55

IR (Film): ny = 2934 (s, b, Sch), 1719 (vs, b, Sch), 1641

(m), 1460 (m, Sch), 1372 (s, Sch), 1237

(vs, b, Sch), 1179 (s, Sch), 1020 (s), 963

(s, Sch), 737 (vs) cm<sup>-1</sup>.

UV (Methanol): lambda<sub>max</sub> (lg epsilon) = 210 (4.33) nm.

MS (20/70 eV): m/e (\*) = 517 (57 [M<sup>+</sup>]), 422 (58), 318 (31), 194 (20), 181 (34), 166 (100), 151 (31), 96 (96), 81 (32), 69 (27), 55 (29), 43 (69).

Hochauflösung: C28H39O6NS ber.: 517.2498 für [M+] gef.: 517.2492

## Beispiel 11: Verbindung 7a

20 mg (0.041 mmol) Epothilon werden in 0.5 ml Methanol gelöst, mit 0.5 ml 1 N Natronlauge versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat

extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol, 85: 15).

### <u>Ausbeute:</u> 11 mg (52 %)

Rf (Dichlormethan/Methanol, 85 : 15): 0.92

IR (Film): ny = 3438 (s, br, Sch), 2971 (vs, br, Sch),
1703 (vs), 1507 (m), 1460 (s, Sch), 1383
(m, Sch), 1254 (w), 1190 (w, br, Sch),
1011 (w, br, Sch), 866 (w, br), 729 (s)
cm<sup>-1</sup>

MS (20/70 eV): m/e (%) = 423 (0.1 [M+]), 323 (4), 168 (89), 140 (100), 85 (31), 57 (67).

Hochauflösung: C23H37O4NS ber.: 423.2443 für [M+] gef.: 423.2410

## Beispiel 12: Verbindung 7b

6.

5 mg (0.009 mmol) 7-0-Acetyl-epothilon werden in 1 ml Methanol gelöst, mit 200  $\mu$ l einer ammoniakalischen Methanollösung (2 mmol NH<sub>3</sub>/ml Methanol) versetzt und zwei Tage bei 50 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

#### <u>Ausbeute:</u> 3 mg (59 %)

Rf (Dichlormethan/Methanol, 90 : 10): 0.63

IR (Film): ny = 3441 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1732 (vs), 1600 (w), 1451 (m), 1375 (m), 1246 (s, b, Sch), 1013 (m, b, Sch)  $cm^{-1}$ 

UV (Methanol): lambdamax (lg epsilon) = 211 (3.75), 247 (3.59) nm.

 $\frac{MS (20/70 \text{ eV}); \text{ m/e (%)} = 567 (1 [M^+]), 465 (4), 422 (7), 388 (5), \\ 194 (5), 182 (7), 168 (65), 164 (17), 140 \\ (100), 97 (10), 71 (22), 43 (27).$ 

Hochauflösung: C29H45O8NS ber.: 567.2866 für [M] gef.: 567.2849

### Beispiel 13:

50 mg Epothilon A werden in 20  $\mu$ l Dimethylsulfoxid angelöst und mit 30 ml Phosphatpuffer (pH 7,1, 30 mM) verdünnt. Nach Zugabe von 5 mg Schweineleberesterase (Fa. Boehringer Mannheim) wird 2 Tage bei 30 °C gerührt. Man säuert mit 2 N HCl auf pH 5 an und extrahiert die Epothilonsäure 7 mit Ethylacetat. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum zur Trockne eingedampft. Ausbeute 48 mg (96 %).

#### Beispiel 14:

48 mg Epothilonsäure 7 werden in 6 ml THF abs. gelöst und unter Rühren mit 40  $\mu$ l Triethylamin und 16  $\mu$ l 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid versetzt. Nach 15 min wird vom Niederschlag abfiltriert und innerhalb von 15 min unter schnellem Rühren in eine siedende Lösung von 20 mg 4-Dimethylaminopyridin in 200 ml Toluol abs. getropft. Nach weiteren 10 min wird im Vakuum eingedampft und der Rückstand zwischen Ethylacetat/Citratpuffer (pH 4) verteilt. Der Eindampfrückstand der organischen Phase ergibt nach präparativer HPLC Trennung 15 mg Epothilon A.

25. September 1996/he

Decrease I and

### Patentansprüche

### 1. Epothilonderivat der Formel 1

(

wobei R = H,  $C_{1-4}$ -Alkyl;  $R^1$ ,  $R^2 = H$ ,  $C_{1-6}$ -Alkyl,  $C_{1-6}$ -Acyl, Benzoyl,  $C_{1-4}$ -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl,  $C_{1-6}$ -Alkoxy-,  $C_{6}$ -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acyl-gruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X und Y entweder gleich oder verschieden sind und jeweils für Halogen, OH, O- $(C_{1-6})$ -Acyl, O- $(C_{1-6})$ -Alkyl, O-Benzoyl stehen.

M M EB

# 2. Epothilonderivat der Formel 2

wobei R = H,  $C_{1-4}$ -Alkyl;  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  = H,  $C_{1-6}$ -Alkyl,  $C_{1-6}$ -Acyl, Benzoyl,  $C_{1-4}$ -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl,  $C_{1-6}$ -Alkoxy-,  $C_{6}$ -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acyl-gruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt.

### 3. Epothilonderivat der Formel 3

(

wobei R = H,  $C_{1-4}$ -Alkyl;  $R^1$ ,  $R^2 = H$ ,  $C_{1-6}$ -Alkyl,  $C_{1-6}$ -Acyl, Benzoyl,  $C_{1-4}$ -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl,  $C_{1-6}$ -Alkoxy-,  $C_{6}$ -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acyl-gruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X allgemein für -C(0)-, -C(S)-, -S(0)-,  $-CR^1R^2$ - und  $-SiR_2$ - steht, wobei R,  $R^1$  und  $R^2$  die Bedeutung haben wie oben angegeben und  $R^1$  und  $R^2$  auch zusammen eine Alkylengruppe mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen bilden können.

# 4. Epothilonderivat der Formel 4

(

wobei R = H,  $C_{1-4}$ -Alkyl;  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  = H,  $C_{1-6}$ -Alkyl,  $C_{1-6}$ -Acyl, Benzoyl,  $C_{1-4}$ -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl,  $C_{1-6}$ -Alkoxy-,  $C_{6}$ -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, X Sauerstoff,  $NOR^3$ ,  $N-NR^4R^5$ , und  $N-NHCONR^4R^5$  bedeutet, wobei die Reste  $R^3$  bis  $R^5$  die oben angegebene Bedeutung haben und  $R^4$  und  $R^5$  auch zusammen eine Alkylengruppe mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen bilden können.

## 5. Epothilonderivat der Formel 5

wobei R = H,  $C_{1-4}$ -Alkyl;  $R^1$ ,  $R^2$  = H,  $C_{1-6}$ -Alkyl,  $C_{1-6}$ -Acyl, Benzoyl,  $C_{1-4}$ -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl,  $C_{1-6}$ -Alkoxy-,  $C_{6}$ -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acyl-gruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X Wasserstoff,  $C_{1-18}$ -Alkyl,  $C_{1-18}$ -Acyl, Benzyl, Benzoyl und Cinnamoyl bedeutet.

#### 6. Epothilonderivat der Formel 6

wobei R = H,  $C_{1-4}$ -Alkyl und R<sup>1</sup> = H,  $C_{1-6}$ -Alkyl,  $C_{1-6}$ -Acyl, Benzoyl,  $C_{1-4}$ -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl,  $C_{1-6}$ -Alkoxy-,  $C_{6}$ -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl

ist, und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt.

# 7. Epothilonderivat der Formel 7

6.

wobei R = H,  $C_{1-4}$ -Alkyl und R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> = H,  $C_{1-6}$ -Alkyl,  $C_{1-6}$ -Acyl, Benzoyl,  $C_{1-4}$ -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl,  $C_{1-6}$ -Alkoxy-,  $C_{6}$ -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl-bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt.

- 8. Verfahren zur Herstellung eines Epothilonderivats der Formel 7 gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man Epothilon A, Epothilon B, ein 3-OH-geschütztes Derivat derselben oder ein 7-OH-geschütztes Derivat derselben
- (a) enzymatisch hydrolysiert, insbesondere mit einer Esterase oder Lipase, oder
- (b) in alkalischem Medium hydrolysiert, insbesondere mit Natriumhydroxid in einem Methanol/Wasser-Gemisch, und das Epothilonderivat der Formel 7 gewinnt und isoliert.
- 9. Verfahren zur Herstellung eines Epothilonderivats der Formel 2 gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man ein

Epothilonderivat der Formel 7 gemäß Anspruch 7 oder als Produkt des Verfahrens gemäß Anspruch 8

- (a) nach der Yamaguchi-Methode oder
- (b) nach der Corey-Methode oder
- (c) nach der Kellogg-Methode in das Epothilonderivat der Formel 2 umwandelt und dieses Umwandlungsprodukt isoliert.
- 10. Mittel für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft und Forstwirtschaft und/oder im Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der Verbindungen gemäß einem der vorangehenden Ansprüche oder einer oder mehreren dieser Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).
- 11. Therapeutisches Mittel, insbesondere zum Einsatz als Cytostatikum, bestehend aus einer oder mehrerer der Verbindungen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 oder einer oder mehrerer der Verbindungen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

 $C_{n_1 \dots n_r}$ 

# Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Epothilonderivate und deren Verwendung.

To the German Patent Office 80297 Munich

***			GERMAN PATENT OF
(1) In the address, give	Shipman of the German Patent Office are to	be directed to:	Application
red, been made	1		for granting a patent
ed, if applicable,	To:		· 1
O. box sumber	Dr. Hans D. Boeters		i !
	Patent Attorney	·	
	Bereiteranger 15	•	File No. (issued by the German
	81541 Munich		Patent Office)
			196 39 456.2
(2)	Reference of the Applicant/	Walantona Na of Ca. Aug	
(-)	Representative (max. 20 digits)	Telephone No. of the Applicant/ Representative	Date
	8299-GBF	089/65 00 86	Sept. 25, 1996
(3)			
(3)	The recipient in field (1) is the If applicable, No. of general power of attorney		
	[] Applicant [] Power of Attorney	[x] Representative	
(4)	Applicant	Representative	
designation of the second	Gesellschaft für Biotechnologische	Dr. Hans D. Boeters	1
Serent from <u>Seld</u> )	Forschung mbH (GBF)	DiplIng. Robert Bauer	1
	Mascheroder Weg 1	Dr. Enno Meyer	i
	38124 Braunschweig	Bereiterunger 15	
		81541 Munich	<b>i</b>
(8)	A-41		
(5)	Application code No.	Representative code No.	Delivery address code No.
			1
(6)	Description of the invention (if no long.	Milmit on a separate sheet in 2 conies)	
•	Epothilone Derivatives, Preparation and Means		
(7)	Other applications		
Columbus and			File No. of the main Application
d Julyanatina en	[] The application is an addition to Patrix Application (to the patrix) $\rightarrow$ [] Application for examination - examination of the application (§ 44 Patrix Law) [] Application for search - determination of published documents without examination		
Program side			
	(§ 43 of the Patent Law)	· ·	· .
	Supply of copies of the determined publication	s fo	
	[ ] Examination process [ ] Research process		1
	[ ] Deferment of the decision of granting to	combs	1
	(§ 49 of Section 2 of the Patent Law) (Messiva	m 15 months from the date of	
	application or priority)		1
(8)	Explanations		File No. of the initial Application
	[ ] Division/exclusion from the Patent Application →		
	[ ] Interested to granting licenses (without obligati		į į
	[ ] With prior laying open and thus agreement with	h are inspection of the documents	
	(§ 31, Section 2, No. 1 of the Patent Law)		·
(9)	[X] Domestic priority (date, file number of the pr	in application) }	(in case of excessive length, submit on
	[] Foreign priority (date, country, file number of	the prior application)	a separate sheet in two coptes)
			28 (rest is illegible)
(10)	Payment of fees in the amount of 100.	00 DM	
physical and cost		ipt () Receipt stamps are attached	(1.2
ermation on the	of advice of receipt		[] charge to my/our account at Dresdoer Bank AG, Munich
was side	VI	reverse side, possibly on	No.:
		a separate abect)	
(11)	Attachments		
schousts 3-7,	1. Power of Attendey	(W) Telefax	sent previously on <u>09/25/96</u>
h 3 copies		•	
- ,	1 naming the inventor     3. 1 summary (optionally with drawings to	Sei.	
	4. 20 pages of specifications	<b>₹</b>	
		•	
	optional reference number list     pages of Pannt Claims	ī	
7	11 ramper of Patent Claims		
	7 pages of drawings		
	8 copy(ics) of prior application	1	
	9	i	
		·	(Dr. Boeters)
		(12) Sign	

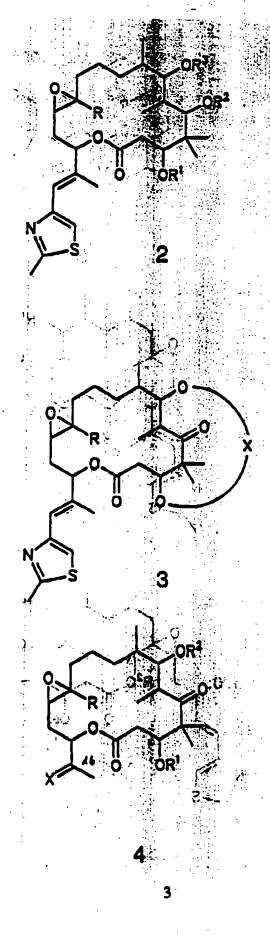
# [BOETERS & BAUER, Patent Attorneys', Letterhead]

September 25, 1996/he

Our Reference: 8299-GBF

# **EPOTHILONE DERIVATIVES, PREPARATION AND MEANS**

The present invention concerns general epothilone derivatives and their use for the production of drugs. Especially, the present invention is concerned with the preparation of epothilone derivatives according to the general Formulas 1 to 7 given below, as well as with their use for the production of therapeutic agents and agents for plant protection.



In the above Formulas 1 to 7, the symbols have the following meanings:

```
R = H, C_{1.4}\text{-alkyl};
R^{1}, R^{2}, R^{3}, R^{4}, R^{5} = H, C_{1.6}\text{-alkyl},
C_{1.6}\text{-acyl-benzoyl},
C_{1.4}\text{-trialkylsilyl},
benzyl,
phenyl,
C_{1.6}\text{-alkoxy-},
```

 $C_6$ -alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; also, two of the groups  $R^1$  to  $R^5$  may be combined to form the grouping -( $CH_2$ )<sub>n</sub>- with n=1 to 6 and the alkyl or acyl groups contained in the groups are either straight-chain or branched groups;

In Formula 1, X and Y are either identical or different and can stand for halogen, OH, O- $(C_{1-6})$ -acyl, O- $(C_{1-6})$ -alkyl, O-benzoyl.

In Formula 3, X generally stands for -C(O)-, -C(S)-, -S(O)-,  $-CR^1R^2$ -, where  $R^1$  and  $R^2$  have the meaning given above and  $-SiR_2$ -, where R has the meaning given above.

In Formula 4, X stands for oxygen, NOR<sup>3</sup>, N-NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>, and N-NHCONR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>, where the groups R<sup>3</sup> to R<sup>5</sup> have the meaning given above.

In Formula 5, X stands for hydrogen,  $C_{1-18}$ -alkyl,  $C_{1-18}$ -acyl, benzyl, benzyl and cinnamoyl.

With regard to epothilone A and B, let us refer to DE-A-41 38 042. Compounds according to general Formula 1 are accessible starting from epothilone A and B, as well as from their 3-O- and/or 7-O-protected derivatives by opening the 12,13-epoxide. When hydrogen halides are used for this purpose in a preferred nonaqueous solvent, the halohydrins X = Hal, Y = OH and Y = OH, Y = Hal are obtained. Protonic acids, for example, toluenesulfonic acid and trifluoroacetic acid, lead to 12,13-diols in the presence of water and then these are acylated subsequently according to standard methods (for example, with carboxylic acid

## **DE Application 196 39 456.2**

anhydrides and pyridine or triethylamine/DMAP) or are alkylated (alkyl halides and silver oxide). For this purpose, the 3- and 7-hydroxy groups can be protected temporarily as the formate (cleaved with NH<sub>3</sub>/MeOH) or p-methoxybenzyl ether (cleaved with DDQ).

Compounds according to general Formula 2 are obtainable from epothilone A and B as well as from their 3-O- and/or 7-O-protected derivatives by reduction, for example, with NaBH<sub>4</sub> in methanol. If the 3-OH and/or 7-OH groups are protected reversibly during this process, after acylation or alkylation, and removal of the protecting groups, 5-O-monosubstituted, 3,5-or 5,7-O-disubstituted derivatives according to general Formula 2 can be obtained.

Reactions of epothilone A and B with bifunctional electrophilic reagents, such as (thio)phosgene, (thio)carbonyldimidazole [sic], thionyl chloride or dialkylsilyl dichlorides or -bistriflates give compounds having general Formula 3. The bases used as aids here can be pyridine, trialkylamine, optionally together with DMAP or 2,6-lutidine in an aprotic solvent. The 3,7-acetals having general Formula 3 are formed by transacetalization, for example, of dimethylacetals, in the presence of an acidic catalyst.

Compounds according to general Formula 4, are obtained from epothilone A and B or from their 3-O- and/or 7-O-protected derivatives by ozonolysis and reductive processing, for example, with dimethyl sulfide. The C-16 ketones can then be converted to the oximes, hydrazones or semicarbazones according to standard methods known to the expert in the field. Furthermore, they are converted to C-16/C-17 olefins by the Wittig, Wittig-Horner, Julia or Petersen olefination method.

The 16-hydroxy derivatives according to general Formula 5 are obtainable by reduction of the C-16 keto group, for example, with aluminum hydride or borohydride. When the 3-OH and 7-OH groups are protected correspondingly, they can be acylated or alkylated selectively. The liberation of the 3-OH- and 7-OH groups is done, for example, with NH<sub>3</sub>/MeOH in the case of O-formyl and with DDQ in the case of O-p-methoxybenzyl.

The compounds having general Formula 6 are obtained from derivatives of epothilone A and B in which the 7-OH group is protected by acyl or ether groups, in which the 3-OH group

6

# DE Application 196 39 456.2

is, for example, formylated, mesylated or tosylated and then eliminated by treatment with a base, for example, DBU. The 7-OH group can be liberated as described above.

Compounds having general Formula 7 are obtained from epothilone A and B or from their 3-OH- and 7-OH-protected derivatives by basic hydrolysis, for example, with NaOH in MeOH or MeOH/water. Preferably, the compounds having general Formula 7 are obtained from epothilone A or B or from their 3-OH- or 7-OH-protected derivatives by enzymatic hydrolysis, preferably with esterases or lipases. The carboxyl group can be converted into the ester by alkylation with diazoalkanes after protection of the 19-OH group.

Furthermore, compounds having Formula 7 can be converted into the compound having Formula 2 by lactonization according to the methods of Yamaguchi (trichlorobenzoyl chloride/DMAP), Corey (aldrithiol/triphenylphosphine) or Kellogg (omega-bromic acid/cesium carbonate). The corresponding methods can be found in Inanaga et al. in Bull. Chem. Soc. Japan, 52 (1979) 1989; Corey & Nicolaou in J. Am. Chem. Soc., 96 (1974) 5614; and Kruizinga & Kellogg in J. Am. Chem. Soc., 103 (1981) 5183.

Furthermore, the invention is concerned with means for plant protection in agriculture, forestry and/or gardening, consisting of one or several of the epothilone derivatives described above or consisting of one or several of the epothilone derivatives described above in addition to one or several of the usual carrier(s) and/or diluent(s).

Finally, the invention is concerned with therapeutic agents, consisting of one or several of the compounds listed above or of one or several of the compounds listed above in addition to one or several of the usual carrier(s) and/or diluent(s). These agents can exhibit especially cytotoxic activities and/or cause immunesuppression so that they can especially preferably be used as cytostatic agents.

The invention is explained further and described by the description of a few selected practical examples.

### Examples

Translator's note: In the infrared spectra in the examples, the general English abbreviations are used, s, m, w, vs, b, etc., except for Sch = shoulder and ny =  $\nu$  (nu) Also, the abbreviation lg stands for log.

### Example 1:

### Compound 1a

20 mg (0.041 mmole) of epothilone A is dissolved in 1 mL of acetone, with 50  $\mu$ L (0.649 mmole) of trifluoroacetic acid is added and the mixture is stirred overnight at 50°C. For work-up, the reaction mixture is treated with 1 M pH 7 phosphate buffer and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer-chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 85:15).

Yield: 4 mg (19%) isomer I 4 mg (19%) isomer II

#### Isomer I

R. (dichloromethane/acetone, 85:15): 0.46

```
IR (P1)m); ny = 3440 (m, b 8ch), 2946 (s, 8ch), 1734

(vs), 1686 (m), 1486 (m), 1375 (w), 1256

(s, 8ch), 1120 (v, b, 8ch), 1071 (m, 8ch),

884 (w), 735 (w) cm<sup>-1</sup>

MS (20/70 eV): m/e (*) = 493 (43 (N-H<sub>2</sub>Q)*), 394 (47), 306 (32),

206 (30), 181 (40), 166 (72), 139 (100),

113 (19), 71 (19), 57 (24), 43 (24).
```

High resolution: C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>O<sub>6</sub>NS calculated: 493.2498 for [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>

found: 493.2478

#### Isomer II

R. (dichloromethane/acetone, 85:15): 0.22

IR (Film): ny = 3484 (s, b, Sch), 2942 (vs, Sch), 1727

(vs), 1570 (w), 1456 (m), 1380 (m), 1265

(s), 1190 (w), 1069 (m), 975 (w), cm<sup>-1</sup>.

MS (20/70 eV): m/e (t) = 493 (21 (M-H<sub>2</sub>O)<sup>+</sup>), 394 (12), 306 (46),

206 (37), 181 (63), 166 (99), 139 (100),

113 (21), 71 (23), 57 (33), 43 (28).

High resolution: C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>O<sub>6</sub>NS calculated: 493.2498 for [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>

found: 493.2475

#### Example 2:

#### Compound 1b

Epothilone A, 55 mg (0.111 mmole), is dissolved in 0.5 mL of tetrahydrofuran, 0.S[sic] mL of 1 N hydrochloric acid is added and the mixture is stirred for 30 minutes at room temperature. Then 1 N phosphate buffer of pH 7 is added and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane/methanol, 90:10). Yield: 19 mg (32%).

# R. (dichloromethane/methanol, 90:10): 0.46

IR (Film): ny = 3441 (s. br. Sch), 2948 (s. Sch), 1725 (vs. Sch), 1462 (m), 1381 (w), 1265 (m), 1154 (w), 972 (m, br. Sch) cm<sup>-1</sup>.

<u>UV (Methanol):</u> lambda<sub>max</sub> (lg epsilon) =-210 (4.29), 248 (4.11) nm.

MS (20/70 eV): m/e (4) = 529 (13 [M+]), 494 (10), 342 (38), 306 (23), 194 (32), 164 (100), 140 (31), 113 (15), 57 (16).

High resolution: C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>O<sub>6</sub>ClNS calculated: 5

529.2265 for [M<sup>+</sup>],

found; 529.2280

#### Example 3:

#### Compound 1c

12-Chloro-13-hydroxy-epothilone A (1b), 25 mg (0.047 mmole), is dissolved in 1 mL of dichloromethane, and then 29 mg (0.235 mmole) of dimethylaminopyridine, 151  $\mu$ L (1.081 mmole) of triethylamine and 20  $\mu$ L (0.517 mmole) of 98% formic acid are added. The reaction mixture is cooled with ice/sodium chloride. After reaching -15°C, 40  $\mu$ L (0.423 mmole) of acetic anhydride is added to the reaction mixture, followed by stirring for 70 minutes at -15°C. Since the thin-layer chromatogram did not show complete conversion, another 6 mg (0.047 mmole) of dimethylaminopyridine, 7  $\mu$ L (0.047 mmole) of triethylamine, 2  $\mu$ L of 98% formic acid (0.047 mmole) and 4  $\mu$ L (0.047 mmole) of acetic anhydride are added to the reaction mixture, followed by stirring for 60 minutes. For work-up, the reaction mixture is heated to room temperature, 1 M phosphate buffer with pH 7 is added and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 90:10). Yield: 5 mg (18%).

# R. (Dichloromethane/acetone, 90-10): 0.67

IR (Pilm): ny = 3497 (w, b, Sch), 2940 (s, b, Sch), 1725
(vs), 1468 (m, b, Sch), 1379 (m), 1265
(s), 1253 (s), 1175 (vs), 972 (m, b, Sch),
737 (s) cm<sup>-1</sup>

MS (20/70 eV): m/e (%) = 613 (9 [M<sup>+</sup>]), 567 (43), 472 (63), 382 (23), 352 (21), 164 (100), 151 (33), 96 (31), 69 (17), 44 (26).

High resolution: C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>O<sub>9</sub>NSCl calculated: 613.2112 for [M<sup>+</sup>]

found: 613.2131

#### Example 4:

#### Compound 1d

10 mg (0.020 mmole) of epothilone B is dissolved in 0.5 mL of tetrahydrofuran, then 0.5 mL of 1 N hydrochloric acid is added and the mixture stirred for 30 minutes at room temperature. Then 1 M phosphate buffer at pH 7 is added and the aqueous phase is extracted 4 times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and freed from solvent. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 85:15). Yield: 1 mg (9%)

R. (Dichloromethane/acetone, 85:15): 0.38

High resolution: C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O<sub>6</sub>NSCl calculated: 543.2421 for [M<sup>+</sup>]

found: 543.2405

#### Example 5:

#### Compound 2a

Epothilone A, 100 mg (0.203 mmole), is dissolved in 4 mL of tetrahydrofuran/1 M phosphate buffer, pH 7 (1:1) and sodium borohydride (150 mg = 3.965 mmole) is added until the thin-layer chromatogram shows that the starting material reacted completely. Then the mixture is diluted with 1 M phosphate buffer, pH 7 and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done by silica gel chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 95:5 - in 5 steps to dichloromethane/acetone, 85:15).

Yield: (20%)

#### R. (Dichloromethane/acetone, 75:25): 0.27

IR (Film): ny = 3413 (s, 5, Sch), 2965 (vs, Sch), 1734

(vs), 1458 (m, b, Sch), 1383 (m, Sch),

1264 (s, 5, Sch), 1184 (m, b, Sch), 1059

(s, Sch), 966 (s), 885 (w), 737 (m) cm<sup>-1</sup>

MS (20/70 eV): m/e (t) = 495 (67 [M\*]), 477 (s), 452 (12), 394

(9), 364 (16), 306 (49), 194 (19), 178

(35), 164 (100), 140 (40), 83 (21), 55

High resolution: C<sub>26</sub>H<sub>41</sub>O<sub>6</sub>NS

calculated:

495.2655 for [M+]

found:

495.2623

#### Example 6:

#### Compound 3a-d (a-d are stereoisomers)

Epothilone, 100 mg (0.203 mmole) is dissolved in 3 mL of pyridine, with 50  $\mu$ L (0.686 mmole) of thionyl chloride added and the mixture is stirred for 15 minutes at room temperature. Then, 1 M phosphate buffer, pH 7, is added and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product and separation of the four stereoisomers 3a-d is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: toluene/methanol, 90:10).

#### Compound 3a

<u>Yield</u>: 4 mg (12%)

R. (toluene/methanol, 90:10): 0.50

IR (Pilm): ny - 2261 (m. b. Sch); 1742 (vs), 1701 (vs),
1465 (m. Sch), 1389 (m. Sch), 1238 (s.
Sch), 1210 (vs. Sch), 1011 (s. Sch), 957
(s. b. Sch), 808 (m. Sch), 768 (s. Sch)
cm<sup>-1</sup>

UV (Methanol): lembdemax (1g epailon) = 210 (4.50), 248 (4.35) nm.

MS (20/70 eV): m/e (\*) = 539 (40 (M\*)), 457 (22), 362 (16), 316 (27), 222 (30), 178 (30), 164 (100), 151 (43), 96 (38), 69 (29), 55 (28), 43 (20).

High resolution: C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>O<sub>7</sub>NS<sub>2</sub> calculated: 539.2011 for [M<sup>+</sup>]

Compound 3b

Yield: 14 mg (13%)

R (toluene/methanol, 90:10): 0.44

IR (Pilm): ny = 2963, (% hb. Schler 1740 (vs), 1703 (s),
1510 (w) 12464 (m, br. Sch), 1389 (m,
Sch), 1240 (6, br. Sch), 1142 (m), 1076
(w) 1037 (vl. 1003 (m), 945 (s, br. Sch),
806 (m, Schler75 (s), 737 (m) cm<sup>-1</sup>.

MS (20/70 eV): m/e (+) = 539 (27 [M<sup>+</sup>]), 475 (17), 322 (41), 306 (67), 222 (16), 206 (17), 194 (19), 178 (32), 164 (100), 151 (33), 125 (18), 113 (15), 96 (19), 81 (23), 64 (58), 57 (42), 41 (19)

High resolution:  $C_{26}H_{37}O_7NS_2$  calculated: 539.2011 for [M<sup>+</sup>] found: 539.1998

Compound 3c

Yield: 4 mg (4%)

R. (toluene/methanol. 90:10): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (1) = 539.(51) [161] \( \) (22), 306 (53), 222 (36), 178 (31), 164 (100), 151 (41), 96 (25), 81 (25), 69 (26), 55 (25), 41 (25).

High resolution: C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>O<sub>7</sub>NS<sub>2</sub>

calculated:

539.2011 for [M<sup>+</sup>]

found:

539.2001

#### Compound 3d

Yield: 1 mg (1%)

R. (toluene/methanol. 90:10): 0.33

MS (20/70 EV); m/e (%) - 539 (69 (MT)); 322 (35), 306 (51), 222 (41), 178 (32), 164 (100), 151 (46), 96 (31), 81 326; 69 (34), 55 (33), 41 (35)

High resolution: C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>O<sub>7</sub>NS<sub>2</sub>

calculated:

539.2011 for [M+]

found:

539.1997

#### Example 7:

#### Compound 4a

Epothilone A, 10 mg (0.020 mmole), is dissolved in 2 mL of dichloromethane, cooled to -70°C and then treated with ozone for 5 minutes until a weak blue coloration develops. The resulting reaction mixture is then treated with 0.5 mL of dimethyl sulfide and heated to room temperature. In the work-up, the solvent is removed from the reaction mixture and finally the product is purified with preparative layer chromatography (solvent dichloromethane/acetone/methanol, 85:10:5).

<u>Yield</u>: 5 mg (64%)

R. (Dichloromethane/acetone/methanol, 85:10:5): 0.61

IR (P1)m): ny = 3468 (8. br. Sch), 2947 (8. br. Sch), 1734 (V8. Sch), 1458 (w), 1380 (w), 1267 (w), 1157 (w), 1080 (w), 982 (w) cm-1

DV (Methanol): lambdager (lg epsilon) = 202 (3.53) nm.

A

MS (20/70 eV): m/e (%) - 398 (2 [M\*]), 380 (4), 267 (14), 249 (17), 211 (20), 193 (26), 171 (34), 139 (34), 111 (40), 96 (100), 71 (48), 43 (50).

High resolution: C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>O<sub>7</sub> calculated: 398.2305 for [M<sup>+</sup>]

found: 398.2295

#### Example 8:

#### Compound 6a

3,7-Di-O-formyl-epothilone A, 10 mg (0.018 mmole), is dissolved in 1 mL of dichloromethane, 27  $\mu$ L (0.180 mmole) of 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) is added and the mixture stirred at room temperature for 60 minutes.

For work-up, the reaction mixture is treated with 1 M sodium dihydrogen phosphate buffer, pH 4.5, and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. After elimination of the solvent, the resulting crude product is dissolved in 1 mL of methanol, treated with 200 µL of ammoniacal methanol solution (2 mmole of NH<sub>2</sub>/mL of methanol) and stirred overnight at room temperature. For work-up, the solvent is removed in vacuum.

Yield: 4 mg (22%)

R. (Dichloromethane/acetone, 85:15): 0.46

IR (Pilm): ny = 3445 (w, br. Sch), 2950 (ve, br. Sch),
1717 (vs. Sch), 1644 (w), 1466 (m, Sch),
1370 (m, SCh), 1267 (s, br. Sch), 1179 (s,
Sch), 984 (s, Sch), 860 (w), 783 (m) cm<sup>-1</sup>

UV (Methanol): lambdamax (lg epsilon): = 210 (4.16) nm.

MS (20/70 eV): m/e (4) = 475 (28 [M<sup>2</sup>]), 380 (21), 322 (37), 318 (40), 304 (65), 178 (31), 166 (100), 151 (29), 140 (120), 96 (38), 81 (20), 57 (26).

High resolution: C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>O<sub>5</sub>NS calculated: 475.2392 for [M<sup>+</sup>]

found: 475.2384

#### Example 9:

#### Compound 6b

3,7-Di-O-formyl-epothilone A, 50 mg (0.091 mmole), is dissolved in 1 mL of dichloroethane, 2 mL (0.013 mole) of 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) is added and the mixture stirred for 12 hours at 90°C.

For work-up, the reaction mixture is treated with 1 M sodium dihydrogen phosphate buffer, pH 4.5, and the aqueous phase extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent removed. The purification of the crude product, which consists of two compounds, is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane-/acetone, 90:10).

<u>Yield</u>: 7 mg (15%)

#### Substance code

R. (Dichloromethane/acetone, 90:10): 0.62

IR (Film): ny - 2951 (m. br. Sch), 1723 (vs), 1644 (w. br. Sch), 1468 (w), 1377 (w), 1271 (m. br. Sch), 1179 (s), 987 (m. br. Sch), 735 (w. br. Sch) cm 1.

UV (Methanol): lambdamax (lg epsilon) = 210 (4.44) nm.

MS (20/70 eV): m/e (4) = 503 (68 [M]), 408 (58), 390 (32), 334 (25), 316: (34), 220 (21), 206 (27), 194 (20), 181 (33), 164 (100), 151 (34), 139 (28), 113 (20), 96 (82), 81 (33), 67 (24), 55 (26), \$3 (22).

High resolution: C<sub>77</sub>H<sub>37</sub>O<sub>6</sub>NS

calculated:

503.2342 for [M<sup>+</sup>]

found:

**503.23**03

# Example 10:

# Compound 6c

3,7-Di-O-acetyl-epothilone, 5 mg (0.009 mmole), is dissolved in 1 mL of methanol, 150  $\mu$ L of an ammoniacal methanol solution (2 mmole of NH<sub>2</sub>/mL of methanol) is added and the mixture stirred overnight at 50°C.

For work-up, the solvent is removed in vacuum and the crude product is purified with the aid of preparative layer chromatography (solvent: toluene/methanol, 90:10).

Yield: 3 mg (67%)

R. (Dichloromethane/acetone, 90:10): 0.55

IR (Pilm): ny = 2934 (s. h. Schl., 1719 (vs. b. Sch), 1641
(m), 1460 (m, Sch), 1372 (s. Sch), 1237
(vs. b. Sch), 1179 (s. Sch), 1020 (s), 963
(s. Sch), 737 (vs.) cm<sup>-1</sup>

UV (Methanol): lambdamax (lg epsilon) + 210 (4.33) nm.

MS (20/70 eV): m/e (\*) = 517 (57 [M\*]), 422 (58), 318 (31), 194 (20), 181 (34), 166 (100), 151 (31), 96 (96), 81 (32), 69 (27), 55 (29), 43 (69).

High resolution: C<sub>28</sub>H<sub>39</sub>O<sub>6</sub>NS calculated: 517.2498 for [M<sup>+</sup>]

found 517.2492

#### Example 11:

#### Compound 7a

Epothilone, 20 mg (0.041 mmole), is dissolved in 0.5 mL of methanol, 0.5 mL of 1 N sodium hydroxide is added and the mixture stirred for 5 minutes at room temperature.

For work-up, the reaction mixture is treated with 1 M phosphate buffer, pH 7, and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography. (solvent: dichloromethane/methanol, 85:15).

<u>Yield</u>: 11 mg (52%)

# R. (Dichloromethane/methanol, 85:15): 0.92

IR (P11m); my = 3438 (a, br. Sch), 2971 (vs. br. Sch),
1703 (vs), 1507((m), 1460 (a, Sch), 1383
(m, Sch), 1254 (w), 1190 (w, br. Sch),
1011 (w, br. Sch), 866 (w, br), 729 (a)
cm-1

MS (20/70 eV): m/e (4) - 4235 (0.18 [M<sup>+</sup>]); 323 (4), 168 (89), 140

High resolution: C<sub>21</sub>H<sub>37</sub>O<sub>4</sub>NS

calculated:

423.2443 for [M<sup>+</sup>]

found:

423.2410

# Example 12:

# Compound 7b

5 mg (0.009 mmole) of 7-O-acetyl-epothilone is dissolved in 1 mL of methanol, 200  $\mu$ L of an ammoniacal methanol solution (2 mmole of NH<sub>3</sub>/mL of methanol) is added and the mixture is stirred for 2 days at 50°C. For work-up, the solvent is removed in vacuum. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: toluene/methanol, 90:10).

Yield: 3 mg (59%)

R. (Dichloromethane/methanol, 90:10): 0.63

IR (Film): ny = 3441 (m, b, Schi, 2946 (s, Sch), 1732

(vs), 1600 (w), 1451 (m), 1375 (m), 1246

(s, b, Sch), 1013 (m, b, Sch) cm<sup>-1</sup>

DV (Methanol): lambda<sub>max</sub> (lg opsilon) = 211 (3.75), 247 (3.59) nm.

MS (20/70 eV): m/e (t) = 557 (1 (M\*)), 465 (4), 422 (7), 388 (5), 194 (5), 182 (7), 168 (65), 164 (17), 140 (100), 97 (10), 71 (22), 43 (27).

High resolution: C<sub>29</sub>H<sub>45</sub>O<sub>8</sub>NS calculated: 567.2866 for [M<sup>+</sup>]

found: 567.2849

#### Example 13:

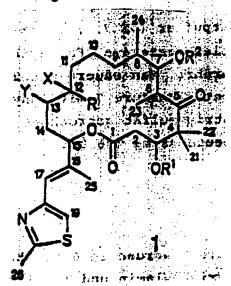
Epothilone A, 50 mg, is dissolved in 20  $\mu$ L of dimethyl sulfoxide and diluted with 30 mL of phosphate buffer (pH 7.1, 30 mM). After addition of 5 mg of pig liver esterase (Boehringer Mannheim), the mixture is stirred for 2 days at 30°C. It is acidified with 2 N HCl to pH 5 and the epothilonic acid 7 is extracted with ethyl acetate. The organic phase is dried with sodium sulfate and evaporated to dryness in vacuum. Yield 48 mg (96%).

# Example 14:

Epothilonic acid 7, 48 mg, is dissolved in 6 mL of absolute THF and 40  $\mu$ L of triethylamine and 16  $\mu$ L of 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride are added under stirring. After 15 minutes, the precipitate is filtered off and, within 15 minutes, under rapid stirring, it is added dropwise to a boiling solution of 20 mg of 4-dimethylaminopyridine in 200 mL of absolute toluene. After another 10 minutes, the mixture is evaporated in vacuum and the residue is partitioned between ethyl acetate/citrate buffer (pH 4). The evaporation residue of the organic phase gives 15 mg of epothilone A after preparative HPLC separation.

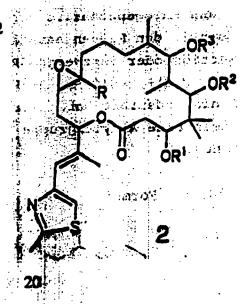
#### **Patent Claims**

# 1. Epothilone derivative having Formula 1



where R = H,  $C_{14}$ -alkyl;  $R^1$ ,  $R^2 = H$ ,  $C_{16}$ -alkyl,  $C_{16}$ -acyl, benzoyl,  $C_{14}$ -trialkylsilyl, benzyl, phenyl,  $C_{16}$ -alkoxy,  $C_{6}$ -alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; and the alkyl and acyl groups in these groups are straight-chain or branched groups and X and Y are either the same or different and stand for halogen, OH, O- $(C_{16})$ -acyl, O- $(C_{16})$ -alkyl, O-benzoyl. [handwritten: -O-, {rest is illegible}]

# 2. Epothilone derivative having formula 2



where R = H,  $C_{1.4}$ -alkyl;  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3 = H$ ,  $C_{1.6}$ -alkyl,  $C_{1.6}$ -acyl, benzoyl,  $C_{1.4}$ -trialkylsilyl, benzyl, phenyl,  $C_{1.6}$ -alkoxy-,  $C_{6}$ -alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups.

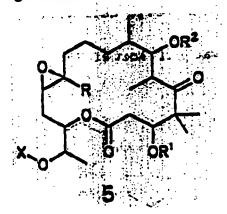
# 3. Epothilone derivative according to formula 3

where R = H,  $C_{14}$ -alkyl;  $R^1$ ,  $R^2 = H$ ,  $C_{1-6}$ -alkyl,  $C_{1-6}$ -acyl, benzoyl,  $C_{14}$ -trialkylsilyl, benzyl, phenyl,  $C_{1-6}$ -alkoxy-,  $C_{6}$ -alkyl-, hydroxy-, and halogen-substituted benzyl and phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups and X stands generally for -C(O)-, -C(S)-, -S(O)-,  $-CR^1R^2$ - and  $-SiR_2$ -, where R,  $R^1$  and  $R^2$  have the meaning given above and  $R^1$  and  $R^2$  together can also form an alkylene group with 2 to 6 carbon atoms.

# 4. Epothilone derivative according to formula 4

where R = H,  $C_{14}$ -alkyl;  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5 = H$ ,  $C_{16}$ -alkyl,  $C_{16}$ -acyl, benzoyl,  $C_{14}$ -trialkylsilyl, benzyl, phenyl,  $C_{16}$ -alkoxy-,  $C_{6}$ -alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups; X stands for oxygen,  $NOR^3$ ,  $N-NR^4R^5$ , and  $N-NHCONR^4R^5$ , where the groups  $R^3$  to  $R^5$  have the meaning given above and  $R^4$  and  $R^5$  together can form an alkylene group with 2 to 6 carbon atoms;

# 5. Epothilone derivative having formula 5



where R = H,  $C_{1.4}$ -alkyl;  $R^1$ ,  $R^2 = H$ ,  $C_{1.6}$ -alkyl,  $C_{1.6}$ -acyl, benzoyl,  $C_{1.4}$ -trialkylsilyl, benzyl, phenyl,  $C_{1.6}$ -alkoxy-,  $C_{6}$ -alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups and X stands for hydrogen,  $C_{1.18}$ -alkyl,  $C_{1.18}$ -acyl, benzyl, benzoyl and cinnamoyl.

# 6. Epothilone derivative according to formula 6

in which R = H,  $C_{14}$ -alkyl and  $R^1 = H$ ,  $C_{16}$ -alkyl,  $C_{16}$ -acyl, benzoyl,  $C_{14}$ -trialkylsilyl, benzyl, phenyl,  $C_{16}$ -alkoxy-,  $C_{6}$ -alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups.

# 7. Epothilone derivative according to formula 7

in which R = H,  $C_{1.4}$ -alkyl; and  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4 = H$ ,  $C_{1.6}$ -alkyl,  $C_{1.6}$ -acyl, benzyl, benzyl, phenyl,  $C_{1.6}$ -alkoxy-,  $C_{6}$ -alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl

or phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups.

- 8. Method for the preparation of an epothilone derivative having formula 7, according to Claim 7, characterized by the fact that epothilone A, epothilone B, a 3-OH-protected derivative of these or a 7-OH-protected derivative of these is
- (a) hydrolyzed enzymatically, especially with an esterase or lipase, or
- (b) is hydrolyzed in an alkaline medium, especially with sodium hydroxide, in a methanol/water mixture, and the epothilone derivative having formula 7 is obtained and isolated.
- 9. Method for the preparation of an epothilone derivative having formula 2, according to Claim 2, characterized by the fact that an epothilone derivative having formula 7, according to Claim 7, or as product of the method according to Claim 8, is converted into the epothilone derivative having formula 2 according to
- (a) the Yamaguchi method or
- (b) the Corey method or
- (c) the Kellogg method and then this conversion product is isolated.
- 10. Means for plant protection in agriculture and forestry and/or in gardening, consisting of one or several of the compounds according to one of the previous Claims, or one or several of these compounds together with one or several usual carrier(s) and/or diluent(s).
- 11. Therapeutic agent, especially for use as cytostatic agent, consisting of one or several of the compounds according to one or several of Claims 1 to 7, or one or several compounds according to one or several of Claims 1 to 7 together with one or several of the usual carrier(s) and/or diluent(s).

#### Summary

The present invention is concerned with epothilone derivaties and with their use.

# This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

# **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

# IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

☐ OTHER:

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.